

## B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství<sup>7a)</sup>.

### 1.1 ÚVOD

Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA) byla dostatečně validována a uznána, což opravňuje její přijetí jako nové metody<sup>7a)</sup>. Jedná se o druhou metodu zkoušení na pokusných zvířatech zaměřenou na hodnocení potenciálu chemických látek senzibilizovat kůži. První metoda (B.6) využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test<sup>7a)</sup>.

LLNA poskytuje alternativní postup pro identifikaci chemických látek způsobujících senzibilizaci kůže a pro potvrzení, že chemické látky nemají významný potenciál senzibilizovat kůži. To však neznamená, že by se metoda LLNA měla ve všech případech používat namísto zkoušek na morčatech; znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky již nevyžadují žádné další potvrzování.

LLNA poskytuje určité výhody, pokud jde o vědecký pokrok a dobré životní podmínky pokusných zvířat. Metoda zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení vztahu dávky a odezvy. Podrobné údaje o validaci metody LLNA a přehled prací spojených s touto metodou byly publikovány<sup>7a)</sup>. Kromě toho je třeba poznamenat, že mírně nebo středně silně senzibilizující látky, které se doporučují jako vhodné pozitivní kontrolní látky u zkoušek na morčatech, jsou vhodné také pro metodu LLNA<sup>7a)</sup>.

LLNA je metodou *in vivo* a jako taková neeliminuje používání pokusných zvířat při hodnocení senzibilizující aktivity působící kontaktem. Tato metoda však umožňuje snížit počet pokusných zvířat, která jsou k tomuto účelu nezbytná. Kromě toho LLNA nabízí podstatné zjemnění způsobu, jakým se pokusná zvířata používají ke zkoušení kontaktní senzibilizace. Metoda LLNA je založená na posouzení imunologických jevů navozených chemickými látkami během indukční fáze senzibilizace. Na rozdíl od zkoušek na morčatech metoda LLNA nevyžaduje vyvolávání kožní přecitlivělosti navozené provokační reakcí. Kromě toho metoda LLNA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech. Díky tomu metoda LLNA snižuje utrpení pokusných zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA ve srovnání s tradičními maximalizačními zkouškami na morčatech, je třeba si uvědomit, že zde existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití tradičních zkoušek na morčatech (např. falešně negativní výsledky při

použití LLNA s určitými kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže)<sup>7a)</sup>.

## 1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Základní princip metody LLNA spočívá v tom, že senzibilizátory navozují primární proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace chemické látky. Toto zmnožení je úměrné aplikované dávce (a potenciálu alergenu) a poskytuje jednoduchý prostředek pro získání objektivního, kvantitativního měření senzibilizace. LLNA hodnotí tuto proliferaci jako vztah dávka-odezva a za tímto účelem se porovnává proliferace ve zkušebních skupinách s proliferací u skupin, kterým se podává vehikulum. Poměr proliferace u exponovaných skupin a u skupin s vehikulem, nazvaný index stimulace, musí být alespoň 3, než lze zkoušenou látku dále hodnotit jako možný senzibilizátor kůže. Metody, které jsou zde popsány, jsou založené na používání radioaktivního značení pro měření proliferace buněk. Pro hodnocení této proliferace je však možné použít i další koncová vyhodnocení, a to za předpokladu, že jsou zdůvodněná a existují pro ně vhodné vědecké důkazy, včetně úplných citací a popisu metodiky.

## 1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

### 1.3.1 Přípravy

#### 1.3.1.1 *Podmínky chovu a krmení*

Pokusná zvířata se chovají odděleně. Teplota ve zkušební místnosti pro pokusná zvířata by měla být  $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . Ačkoliv by relativní vlhkost měla být alespoň 30 % a neměla by s výjimkou čištění místnosti překročit 70 %, je cílem hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky v souladu s příslušným právním předpisem<sup>10)</sup>, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

#### 1.3.1.2 *Příprava pokusných zvířat*

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu<sup>10)</sup> a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu<sup>10)</sup>. Před začátkem aplikace látky se všechna pokusná zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

## 1.3.2 **Zkušební podmínky**

### 1.3.2.1 *Pokusná zvířata*

Druhem zvoleným pro tuto zkoušku je myš. Používají se mladé dospělé samice myši z kmene CBA/Ca nebo CBA/J, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Na začátku podávání dávek by pokusná zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará a odchylky v hmotnosti pokusných zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Ostatní kmeny a samci by se měli používat pouze tehdy, je-li k dispozici dostatek údajů, které by dokazovaly, že v rámci reakcí v metodě LLNA skutečně neexistují žádné specifické odlišnosti mezi kmeny nebo pohlavími.

### 1.3.2.2 *Kontrola spolehlivosti*

Pozitivní kontroly se používají k prokázání odpovídající účinnosti zkoušky a odborné způsobilosti laboratoře úspěšně provést zkoušku. Pozitivní kontrola by měla vyvolat pozitivní reakci v LLNA při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI)  $> 3$  ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Je třeba zvolit takovou pozitivní kontrolní dávku, aby reakce byla zřetelná, nikoliv však přehnaná. K preferovaným látkám patří 2-benzylidenoktanal (CAS 101-86-0, EINECS 202-983-3) a 2-sulfanylbenzothiazol (CAS 149-30-4, EINECS 205-736-8). Mohou existovat určité okolnosti, za niž lze při řádném zdůvodnění použít jiné kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria. I když se pro každou zkoušku obvykle vyžaduje pozitivní kontrolní skupina, mohou se rovněž vyskytnout situace, kdy mají zkušební laboratoře k dispozici předchozí údaje o pozitivní kontrole prokazující homogenitu dostatečné reakce během šesti měsíců nebo delšího časového období. V takovém případě může být vhodnější méně četné testování s pozitivními kontrolami v intervalech, které by neměly být delší než 6 měsíců. Ačkoliv by se pozitivní kontrolní látky měly testovat ve vehikulu, o kterém je známo, že vyvolává trvale stejnou reakci (např. aceton, olivový olej), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní receptura přípravku). V takovém případě je třeba testovat možnou interakci pozitivní kontroly s tímto nestandardním vehikulem.

### 1.3.2.3 *Počet pokusných zvířat, úrovně dávek a výběr vehikula*

Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři pokusná zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije negativní kontrolní skupina, které se podává pouze vehikulum zkoušené látky, a v případě potřeby pozitivní kontrola. Jestliže se shromažďují údaje o jednotlivých pokusných zvířatech, použije se na každou dávkovou skupinu minimálně pět pokusných zvířat. S výjimkou aplikace zkoušené látky se s pokusnými zvířaty v kontrolní skupině zachází naprosto stejným způsobem jako s pokusnými zvířaty v experimentální skupině.

Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře<sup>7a)</sup>. Dávky se vybírají z řady koncentrací 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit již existující údaje o akutní toxicitě a kožní dráždivosti, jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, ale aby současně nevyvolala systémovou toxicitu a nadměrné podráždění kůže<sup>7a)</sup>.

Vehikulum by mělo být vybráno tak, aby se maximalizovaly zkušební koncentrace a rozpustnost k přípravě roztoku/suspenze vhodné pro aplikaci zkoušené látky. Upřednostňují se vehikula v následujícím pořadí: aceton/olivový olej (4:1 obj.), *N,N*-dimethylformamid, ethylmethylketon, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid<sup>7a)</sup>, avšak mohou být použita i jiná vehikula, jsou-li předloženy dostatečné vědecké důvody. V určitých případech může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo komerční recepturu přípravku, v němž je zkoušená látka uváděna na trh. Zvláštní pozornost je třeba věnovat zajištění toho, aby byly hydrofilní materiály zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Z tohoto důvodu není vhodné používat jako vehikulum pouze vodu.

### 1.3.3 Zkušební postup

#### 1.3.3.1 Harmonogram zkoušky

Harmonogram zkoušky je následující:

- *Den 1:*

Každé pokusné zvíře se individuálně zváží a zaznamená se jeho hmotnost. Provede se otevřená aplikace 25  $\mu$ l příslušného ředění zkoušené látky, samotného vehikula nebo pozitivní kontrolní látky (podle vhodnosti) na dorsální část obou uší.

- *Den 2 a 3:*

Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

- *Den 4 a 5:*

Žádná aplikace.

- *Den 6:*

Zaznamená se hmotnost každého pokusného zvířete. Přes ocasní žílu se všem pokusným i kontrolním myším vpíchnou 250  $\mu$ l fyziologického roztoku ve fosfátovém pufru (PBS), obsahujícího 20  $\mu$ Ci ( $7,4 \cdot 10^5$  Bq) [<sup>3</sup>H]thymidinu (tritiovaném na metylu), nebo lze všem myším přes ocasní žílu vpíchnout 250  $\mu$ l PBS obsahujícího 2  $\mu$ Ci ( $7,4 \cdot 10^4$  Bq) [<sup>125</sup>I]joddeoxyuridinu a  $10^{-5}$  M fluordeoxyuridinu.

O pět hodin později se myši usmrtí. Drenující aurikulární lymfatické uzliny z obou uší se vyjmou a shromáždí se v PBS společně pro celou zkušební skupinu (metoda sdružení exponované skupiny), nebo se od každého pokusného zvířete vyjme pár lymfatických uzlin a uloží se do PBS individuálně pro každé pokusné zvíře (metoda individuálního přístupu k pokusným zvířatům)<sup>7a)</sup>.

#### 1.3.3.2 *Příprava buněčné suspenze*

Jedna společná buněčná suspenze s buňkami lymfatických uzlin (LNC) buď od celé exponované skupiny, nebo bilaterálně od jednotlivých pokusných zvířat se připraví pomocí jemné mechanické deagregace přes 200 µm sítko z korozivzdorné oceli. Lymfatické buňky se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a nechají se vysrážet v roztoku s 5 % trichloroctovou kyselinou (TCA) při 4 °C po dobu 18 h<sup>7a)</sup>. Sediment se buď resuspenduje v 1 ml TCA a přemístí do scintilačních kyvet obsahujících 10 ml kapalného scintilátoru pro měření aktivity <sup>3</sup>H, nebo se přenesou přímo do zkumavek pro měření aktivity <sup>125</sup>I.

#### 1.3.3.3 *Stanovení buněčné proliferace (inkorporované radioaktivity)*

Inkorporace [<sup>3</sup>H]thymidinu se měří β-scintilační metodou a vyjádří se v rozpadech za minutu (dpm). Inkorporace [<sup>125</sup>I]joddeoxyuridinu se měří prostřednictvím aktivity <sup>125</sup>I a rovněž se vyjádří v dpm. V závislosti na použitém přístupu se inkorporace vyjádří v dpm na zkušební skupinu (metoda sdružení) nebo v dpm na pokusné zvíře (individuální přístup).

#### 1.3.3.4 *Pozorování*

##### 1.3.3.4.1 *Klinická pozorování*

Pokusná zvířata je třeba jednou denně pečlivě vyšetřit na jakékoli klinické příznaky, ať již ve formě lokálního podráždění v místě aplikace, nebo ve formě systémové toxicity. Všechna sledování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou zvlášť pro každé pokusné zvíře.

##### 1.3.3.4.2 *Tělesná hmotnost*

Jak je uvedeno v odstavci 1.3.3.1, tělesnou hmotnost u jednotlivých pokusných zvířat je třeba zaznamenat na začátku zkoušky a v den plánovaného usmrcení pokusných zvířat.

#### 1.3.4 **Výpočet výsledků**

Výsledky se vyjádří jako index stimulace (SI). Při metodě sdružení exponované skupiny se SI stanoví jako podíl sdružené inkorporované aktivity u jednotlivých experimentálních skupin a sdružené radioaktivity kontrolní skupiny s vehikulem; získá se tak průměrná hodnota SI. Při individuálním přístupu se SI stanoví jako podíl průměrné hodnoty dpm na pokusné zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní

skupiny, a průměrné hodnoty dpm na pokusné zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI pro kontrolní skupiny s vehikulem je proto 1.

Použití individuálního přístupu při výpočtu SI umožní provést statistickou analýzu dat. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu si musí být experimentátor vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci dat nebo neparametrickou statistickou analýzu. Správný přístup k analýze dat spočívá ve vyhodnocení veškerých individuálních dat exponovaných pokusných zvířat a kontrol s vehikulem a proložení regresní křivky závislosti odezvy na dávce při zohlednění intervalů spolehlivosti<sup>7a)</sup>. V každém případě si však experimentátor musí uvědomovat možné „odlehle“ reakce u jednotlivých pokusných zvířat v rámci skupiny, které mohou vyžadovat použití jiného hodnocení odezvy (např. použití mediánu namísto průměru) nebo vyřazení těchto odlehlých hodnot.

Do rozhodování, zda jde o pozitivní odezvu, se zahrnuje index stimulace  $\geq 3$  a zohledňuje se závislost odezvy na dávce a popřípadě statistická významnost<sup>7a)</sup>.

Je-li nezbytné objasnit získané výsledky, je třeba věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky, včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda způsobuje nadměrné podráždění kůže a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce<sup>7a)</sup>.

## 2 DATA

Data se shrnou do tabulky, přičemž pro každou dávkovou skupinu se uvedou průměrné a individuální hodnoty dpm a indexy stimulace (včetně kontrolní skupiny s vehikulem).

## 3 PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

V souladu s příslušnými právními předpisy<sup>9),10)</sup> musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, je-li k dispozici; zdroj, čistota, známé nečistoty; číslo šarže),
- skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. těkavost, stálost, rozpustnost),
- jedná-li se o směs, složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

#### Vehikulum:

- identifikační údaje (čistota; popřípadě koncentrace; použitý objem),
- zdůvodnění výběru vehikula.

#### Pokusná zvířata:

- použitý druh myši,
- mikrobiologický stav pokusných zvířat, je-li znám,
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat.

#### Zkušební podmínky:

- podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,
- zdůvodnění výběru dávek, včetně výsledků z orientační studie, pokud byla provedena; použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství látky,
- podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody).

#### Kontrola spolehlivosti:

- souhrn výsledků z poslední kontroly spolehlivosti, včetně informací o použité látce, koncentraci a vehikulu,
- data ze souběžných nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin pro danou laboratoř.

#### Výsledky:

- individuální hmotnosti pokusných zvířat na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení,
- tabulka průměrných (sdružená metoda) a individuálních (individuální přístup) hodnot dpm a rovněž rozpětí hodnot u obou přístupů a indexy stimulace pro jednotlivé dávkové skupiny (včetně kontrolní skupiny s vehikulem),
- případná statistická analýza,
- u každého pokusného zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně kožního podráždění v místě aplikace, pokud k němu dojde.

Diskuse a interpretace výsledků.

- stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále a závěr, zda lze zkušební látku považovat za senzibilizátor kůže.

Závěry.



## B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVČÍCH

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství<sup>7a)</sup>.

Tato zkušební metoda byla navržena za účelem získání informací, které jsou nezbytné ke schválení nebo k další charakterizaci potenciální neurotoxicity chemických látek u dospělých pokusných zvířat. Tuto metodu lze buď kombinovat s již existujícími zkušebními metodami pro studium toxicity po opakovaných dávkách, nebo ji lze provést jako samostatnou zkoušku. Pro usnadnění plánování studií založených na této zkušební metodě se doporučuje prostudovat Doporučení OECD o strategiích a metodách zkoušení neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods)<sup>7a)</sup>. To je zvláště důležité tehdy, je-li třeba zvážit změnu sledování a zkušebních postupů, jak jsou doporučeny pro rutinní používání této metody. Doporučení byla připravena pro usnadnění výběru zkušebních postupů pro specifické podmínky použití. Posouzení vývojové neurotoxicity není předmětem této metody.

### 1.1 ÚVOD

Při posuzování a vyhodnocování toxických vlastností chemických látek je velmi důležité zvážit potenciál neurotoxických účinků. Již metoda zkoušení systémové toxicity po opakované dávce obsahuje sledování, která mají odkrýt potenciální neurotoxicitu. Předloženou zkušební metodu lze používat při plánování studie za účelem získání dalších informací o neurotoxických účincích zjištěných při studii systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo pro jejich potvrzení. Z úvah o potenciální neurotoxicitě určitých druhů chemických látek však může vyplynout, že by mohla být vhodněji posouzena pomocí této metody, pokud neexistují údaje o potenciální neurotoxicitě ze studií systémové toxicity po opakovaných dávkách. Tyto úvahy zahrnují například

- pozorování neurologických příznaků nebo neuropatologických lézí v jiných studiích toxicity než studiích systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo
- strukturní podobnost nebo jiné informace, které posuzovanou látku váží se známými neurotoxickými látkami.

Kromě toho mohou existovat i další případy, kdy je použití této metody vhodné; další podrobnosti jsou uvedeny v literatuře<sup>7a)</sup>.

Tato metoda byla navržena tak, aby ji bylo možné přizpůsobit zvláštním potřebám při potvrzování specifické histopatologické a behaviorální neurotoxicity chemických látek a při charakterizaci a kvantifikaci neurotoxických účinků.

Dříve se za neurotoxicitu považovaly neuropatie zahrnující neuropatologické léze nebo neurologické dysfunkce, jako např. záchvaty, ochrnutí nebo třes. I když jsou neuropatie významným projevem neurotoxicity, dnes je již jasné, že existují mnohé další příznaky toxicity pro nervový systém (např. ztráta motorické koordinace, sensorické výpadky, poruchy učení a paměti), které se nemusí projevovat ani neuropatií, ani v jiných typech zkoušek.

Tato metoda zkoušení neurotoxicity je navržena tak, aby odhalovala závažné neurobehaviorální a neuropatologické účinky na dospělé hlodavce. Zatímco behaviorální účinky i při nepřítomnosti morfoloogických změn mohou odrážet nepříznivý vliv na organismus, neznamená to, že všechny behaviorální změny jsou specifické pro nervový systém. Z tohoto důvodu by se měly jakékoliv zjištěné změny vyhodnotit v korelaci s histopatologickými, hematologickými nebo biochemickými výsledky. Zkoušení požadované v této metodě za účelem charakterizace a kvantifikace neurotoxických odpovědí zahrnuje specifické histopatologické a behaviorální postupy, které lze navíc podpořit elektrofyzilogickým nebo biochemickým vyšetřením<sup>7a)</sup>.

Neurotoxické látky mohou působit na množství cílových struktur v rámci nervového systému a prostřednictvím různých mechanismů. Protože neexistuje jediná sada zkoušek pro posouzení neurotoxického potenciálu u všech látek, může být nezbytné využít dalších zkoušek *in vivo* nebo *in vitro*, které jsou specifické pro typ pozorované nebo očekávané neurotoxicity.

Tuto zkušební metodu lze použít také společně s doporučeními OECD o strategiích a metodách testování neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods)<sup>7a)</sup> při plánování zkoušek určených k další charakterizaci nebo zvýšení citlivosti kvantifikace vztahu dávka-odezva s cílem lépe odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky, anebo potvrdit známá nebo očekávaná rizika chemických látek. Lze například navrhnout zkoušky, které by identifikovaly a zhodnotily neurotoxický mechanismus (neurotoxické mechanismy) nebo doplnily údaje, které již byly získány základními neurobehaviorálními a neuropatologickými vyšetřovacími postupy. Takové studie nemusí replikovat údaje použitím standardních postupů doporučených v této metodě, jsou-li takové údaje již k dispozici a nepovažují se za nezbytné k interpretaci výsledků z této studie.

Používá-li se tato zkouška neurotoxicity samotná nebo v kombinaci, poskytuje informace, které mohou

- určit, zda zkoušené chemické látky ovlivňují nervový systém trvale, nebo vratně,
- přispět k charakterizaci změn nervového systému spojených s expozicí chemické látky a přispět k pochopení mechanismů účinku,

- stanovit vztahy mezi dávkou a odezvou a časem a odezvou s cílem odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky (NOAEL) (kterou lze použít pro vytvoření bezpečnostních kritérií pro chemickou látku).

Tato zkušební metoda používá orální aplikaci zkušební látky. Jiné typy aplikace (např. kožní nebo inhalační) mohou být vhodnější a mohou si také vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích.

## 1.2 DEFINICE

**Nepříznivý účinek:** je jakákoliv změna spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí.

**Neurotoxita:** je nepříznivá změna struktury nebo funkce nervového systému, která je výsledkem expozice chemickému, biologickému nebo fyzikálnímu činiteli.

**Neurotoxické agens:** je jakýkoliv chemický, biologický nebo fyzikální činitel, který má neurotoxický potenciál.

## 1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená chemická látka se podává orálně v různých dávkách několika skupinám pokusných hlodavců. Obvykle se vyžaduje podávání opakovaných dávek a dávkovací režim může být buď 28 denní, nebo subchronický (90 dnů), nebo chronický (1 rok nebo déle). Postupy stanovené v této zkušební metodě lze použít i při studii akutní neurotoxicity. Pokusná zvířata jsou testována za účelem zjištění nebo charakterizace behaviorálních nebo neurologických odchylek. Během každého pozorovacího období se hodnotí řada znaků chování, které by mohly být ovlivněny neurotoxickými látkami. Na konci zkoušky se u podskupiny pokusných zvířat obou pohlaví z každé skupiny provede perfuze *in situ* a připraví se a vyšetří řezy mozku, míchy a periferních nervů.

Pokud se zkouška provádí jako samostatná zkouška pro vyšetření neurotoxicity nebo charakterizaci neurotoxických účinků, lze pokusná zvířata z každé skupiny, která nebyla použita k perfuzi a k následnému histopatologickému vyšetření (viz tabulka 12), použít ke specifickým neurobehaviorálním, neuropatologickým, neurochemickým nebo elektrofyziologickým vyšetřením, která mohou doplnit údaje získané ze standardních vyšetření vyžadovaných v této metodě<sup>7a)</sup>. Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, jestliže empirická pozorování nebo předpokládané účinky naznačují specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity chemické látky. Zbývající pokusná zvířata lze případně použít k některým jiným hodnocením, jako jsou např. hodnocení požadovaná ve zkušebních metodách u studií toxicity po opakovaných dávkách na hlodavcích.

Pokud se postupy této zkušební metody kombinují s postupy z jiných zkušebních metod, je nezbytný dostatečný počet pokusných zvířat, aby byly splněny požadavky pro pozorování v obou studiích.

#### 1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

##### 1.4.1 Výběr živočišných druhů

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, i když lze po odpovídajícím zdůvodnění použít i jiné druhy hlodavců. Použity by měly být běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých pokusných zvířat. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení, nejlépe když pokusná zvířata dosáhnou stáří šesti týdnů a v každém případě dříve, než dosáhnou stáří devíti týdnů. Pokud se však tato zkouška kombinuje s dalšími zkouškami, je možné, že požadavky týkající se stáří pokusných zvířat budou vyžadovat určité změny. Na začátku studie by měl být u používaných pokusných zvířat jen minimální rozptyl hmotnosti a neměl by překročit 20 % průměrné hmotnosti u jednotlivých pohlaví. Pokud se před dlouhodobou studií provádí orientační krátkodobá studie toxicity po opakovaných dávkách, je třeba u obou studií použít pokusná zvířata ze stejných kmenů a stejného zdroje.

##### 1.4.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota ve zkušební místnosti pro pokusná zvířata by měla být  $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . Relativní vlhkost by měla být alespoň 30 %, neměla by však překročit 70 % během čištění místnosti a cílem je hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Náhlé hlasité zvuky je třeba omezit na minimum. Ke krmení by se mělo používat obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezeným přísunem pitné vody. Na výběr krmiva může mít vliv nutnost zajistit vhodnou přísadu pro zkoušenou látku, je-li látka podávána touto metodou. Pokusná zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je lze umístit v klecích v malých skupinkách tvořených pokusnými zvířaty stejného pohlaví v souladu s příslušným právním předpisem<sup>10)</sup>, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak.

##### 1.4.3 Příprava pokusných zvířat

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu<sup>10)</sup> a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu<sup>10)</sup>. Pokusná zvířata by měla být náhodně rozdělena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Jednotlivá pokusná zvířata se jednoznačně identifikují a umístí se do klecí nejméně pět dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

#### 1.4.4 **Způsob aplikace a příprava dávek**

V této zkušební metodě se jedná konkrétně o orální způsob aplikace zkoušené látky. Orální aplikaci lze provádět prostřednictvím žaludeční sondy, krmiva, pitné vody nebo tobolek. Použít lze i jiné způsoby aplikace (např. kožní nebo inhalační), které si mohou vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na typu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích. Je třeba uvést důvody pro výběr způsobu aplikace a odpovídající modifikace postupů v rámci této zkušební metody.

Zkoušená látka se podle potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku/suspense v jiném vehikulu. Je třeba znát toxikologické charakteristiky vehikula. Kromě toho je třeba věnovat pozornost následujícím typickým znakům vehikula: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky a dále účinku na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinku na spotřebu krmiva nebo vody anebo nutriční stav pokusných zvířat.

### 1.5 POSTUPY

#### 1.5.1 **Počet a pohlaví pokusných zvířat**

Pokud se studie provádí jako samostatná studie, je třeba použít v každé dávkové a kontrolní skupině alespoň 20 pokusných zvířat (10 samic a 10 samců) pro vyhodnocení podrobných klinických a funkčních pozorování. Alespoň u pěti samců a pěti samic vybraných z těchto deseti samců a samic je třeba na konci zkoušky provést perfuzi *in situ* a použít je k podrobnému neurohistopatologickému vyšetření. V případě, kdy jsou v dané dávkové skupině pozorovány příznaky neurotoxických účinků pouze u omezeného počtu pokusných zvířat, je třeba zvážit přiřazení těchto pokusných zvířat k pokusným zvířatům vybraným pro perfuzi. Pokud se studie provádí v kombinaci se studií toxicity po opakovaných dávkách, je třeba použít odpovídající počet pokusných zvířat, aby bylo možné splnit cíle obou studií. Minimální počet pokusných zvířat na skupinu u nejrůznějších kombinací studií je uveden v tabulce 12. Pokud se plánuje utrácení ve vložených intervalech nebo vytvoření reparační skupiny ke sledování vratných účinků, perzistence nebo zpožděného výskytu toxických účinků po skončení aplikace, nebo se zvažují dodatečná sledování, je třeba zvýšit počet pokusných zvířat, aby se zajistil dostatečný počet pokusných zvířat požadovaných ke sledování a k histopatologickému vyšetření.

#### 1.5.2 **Experimentální a kontrolní skupina**

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina; pokud se však podle jiných údajů neočekávají žádné účinky po opakovaných dávkách 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může být

provedena limitní zkouška. Nejsou-li k dispozici žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozpětí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba s pokusnými zvířaty v kontrolní skupině zacházet naprosto stejným způsobem, jako s pokusnými zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu.

### 1.5.3 **Kontrola spolehlivosti**

Laboratoř provádějící zkoušku by měla předložit údaje prokazující její způsobilost pro uskutečnění zkoušky a citlivost používaných postupů. Takové údaje by měly poskytnout důkaz o schopnosti odhalit a popřípadě kvantifikovat změny v různých ukazatelích doporučených ke sledování, jako jsou např. vegetativní příznaky, reaktivita na smyslové podněty, síla úchopu a motorická aktivita. Informace o chemických látkách, které způsobují různé typy neurotoxických reakcí a které jsou vhodné jako pozitivní kontrolní látky, lze nalézt v literatuře<sup>7a)</sup>. Historické údaje lze použít tehdy, pokud zůstanou stejné základní aspekty experimentálních postupů. Doporučuje se pravidelná aktualizace historických údajů. Nové kontrolní údaje by měly být doplněny tehdy, pokud provádějící laboratoř v průběhu zkoušky změní některý základní prvek provádění zkoušky nebo postupu.

### 1.5.4 **Výběr dávky**

Úroveň dávek je třeba vybrat s ohledem na předchozí zjištěnou toxicitu a kinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo podobné látky. Nejvyšší úroveň dávky se zvolí tak, aby vyvolala neurotoxické nebo jasné systémové toxické účinky, aby bylo možné prokázat závislost odpovědi na dávkách a úroveň dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL), zvolí se sestupná posloupnost úrovní dávek. V zásadě je třeba stanovit úroveň dávek tak, aby bylo možné odlišit primární toxické účinky na nervový systém od systémové toxicity. Obvykle jsou optimální dva až tři intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). Rovněž je třeba vzít v úvahu i odhad úrovně expozice u člověka, je-li k dispozici.

### 1.5.5 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné neurotoxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není nezbytné provádět kompletní studii za použití tří úrovní dávek. V některých případech předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky. Při provedení

akutní zkoušky orálně by dávka pro limitní zkoušku měla být alespoň 2 000 mg/kg.

#### 1.5.6 Aplikace dávek

Zkoušená látka se podává pokusným zvířatům denně, 7 dnů v týdnu, po dobu alespoň 28 dnů. Použití 5 denního dávkovacího režimu nebo kratší expozice je třeba zdůvodnit. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se podávat v jedné dávce pomocí sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální množství tekutiny, které lze jednorázově podávat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti. V případě vodných roztoků je však možné zvážit i použití až 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žíravých látek, které při vyšších koncentracích obvykle vyvolají prudké účinky, by se měly změny množství zkoušené látky minimalizovat upravením koncentrace, aby se na všech úrovních dávek zajistilo konstantní množství.

U látek podávaných prostřednictvím krmiva nebo pitné vody je velmi důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivnilo vyváženost běžného krmiva nebo příjmu vody. Je-li zkoušená látka podávána v krmivu, je třeba používat buď konstantní dietní koncentrace (v ppm), nebo konstantní úroveň dávky, pokud jde o tělesnou hmotnost pokusného zvířete. Použití jiné alternativy je třeba zdůvodnit. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně je třeba dávku přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti pokusného zvířete. Provádí-li se studie opakovaného podávání látky jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, mělo by být v obou studiích používáno stejné krmivo. Není-li u akutní studie možnost podávání dávky v celku, je třeba podávat dávku po menších částech po dobu, která by neměla překročit 24 h.

### 1.6 POZOROVÁNÍ

#### 1.6.1 Četnost pozorování a zkoušek

U studií s opakovanou dávkou by doba pozorování měla pokrýt celé dávkovací období. U studií akutní toxicity pozorování pokračuje ještě 14 dnů po skončení aplikace. U pokusných zvířat v satelitních skupinách, která jsou v období po skončení aplikace chována bez expozice, by pozorování mělo pokrýt i toto období.

Pozorování je třeba provádět dostatečně často, aby bylo možné odhalit jakékoli behaviorální nebo neurologické abnormality s co největší pravděpodobností. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Četnost klinických pozorování a funkčních zkoušek je shrnuta v tabulce 13. Pokud kinetické nebo jiné údaje získané z předchozích studií naznačují potřebu zvolit časové body pozorování nebo zkoušek nebo období po skončení pozorování, je nutné zvolit takový náhradní plán, na

jehož základě lze získat maximální množství informací. Změny plánu je třeba zdůvodnit.

#### 1.6.1.1 *Pozorování celkového zdravotního stavu a mortality/morbidity*

U všech pokusných zvířat se alespoň jednou denně pečlivě kontroluje jejich zdravotní stav a nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech pokusných zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

#### 1.6.1.2 *Podrobná klinická pozorování*

Podrobná klinická pozorování se provedou u všech pokusných zvířat vybraných k těmto účelům (viz tabulka 12) nejprve před první expozicí (aby bylo možné intraindividuální srovnání) a poté v různých intervalech podle trvání studie (viz tabulka 13). Podrobná klinická pozorování u satelitních zotavovacích skupin se provedou na konci zotavovacího období. Podrobná klinická pozorování se provádějí mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru. Pozorování se pečlivě zaznamenají pomocí systémů hodnocení, které zahrnují kritéria nebo bodovací stupnice pro jednotlivá měření v rámci pozorování. Používaná kritéria nebo stupnice musí být explicitně definována zkušební laboratoří. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší (a nesouvisely systematicky s aplikací) a aby vyšetření prováděly osoby, které nejsou informovány o skupině, do které pokusné zvíře patří.

Doporučuje se provádět pozorování strukturovaně, přičemž se u každého pokusného zvířete při každém pozorování systematicky používají jasné definovaná kritéria (včetně definice normálního „rozpětí“). „Normální rozpětí“ je třeba dostatečně zdokumentovat. Všechny pozorované příznaky se zaznamenají. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost pozorovaných příznaků. Klinická pozorování zahrnují kromě změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a autonomních funkcí (slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace a zbarvení moči).

Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního pozorovacího prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí nebo třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

#### 1.6.1.3 *Funkční zkoušky*

Podobně jako podrobná klinická pozorování se u jednotlivých pokusných zvířat vybraných k těmto účelům provedou i funkční zkoušky – nejprve před expozicí a potom vícekrát po jejím provedení (viz tabulka 12).



Četnost funkčního testování závisí rovněž na trvání studie (viz tabulka 13). Mimo dobu pozorování stanovenou v tabulce 13 se provede také funkční pozorování satelitní zotavovací skupiny, a to těsně před plánovaným utracením. Funkční zkoušky zahrnují reakce na různé smyslové podněty [např. sluchové, zrakové a dotykové (případně taktilní) podněty<sup>7a)</sup>], hodnocení síly stisku<sup>7a)</sup> a hodnocení motorické aktivity<sup>7a)</sup>. Motorická aktivita se měří pomocí automatického přístroje schopného odhalit jak snížení, tak i zvýšení této aktivity. Pokud se použije jiný systém, měl by být kvantitativní a je třeba prokázat jeho citlivost a spolehlivost. Každý přístroj je nutné otestovat, aby se zajistila jeho spolehlivost po celé časové období a homogenita s ostatními přístroji. Další podrobnosti o postupech, kterými se lze řídit, jsou uvedeny v příslušných odkazech. Pokud neexistují žádné údaje (např. údaje o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, epidemiologické údaje, jiné toxikologické studie), které by ukazovaly na potenciální neurotoxické účinky, je nutné za účelem podrobnějšího vyšetření těchto možných účinků zvážit začlenění specializovanějších zkoušek smyslových a motorických funkcí nebo učení a paměti. Další informace o specializovanějších zkouškách a jejich používání je uvedeno v literatuře<sup>7a)</sup>.

Ve výjimečných případech lze pokusná zvířata vykazující známky toxicity v takové míře, která by významně narušila provedení funkční zkoušky, z této zkoušky vyřadit. Vyřazení těchto pokusných zvířat z funkčních zkoušek je nutné zdůvodnit.

#### 1.6.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva a vody**

U studií s délkou trvání do 90 dnů se všechna pokusná zvířata váží alespoň jednou týdně a každý týden se rovněž provádí měření spotřeby krmiva (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média). U dlouhodobých studií se všechna pokusná zvířata váží alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou za 4 týdny. Během prvních 13 týdnů se měří spotřeba krmiva (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média) a poté přibližně v tříměsíčních intervalech, pokud si změny zdravotního stavu nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jiný interval.

#### 1.6.3 **Oftalmologické vyšetření**

U studií delších než 28 dnů se před aplikací zkoušené látky a před ukončením studie provede oftalmologické vyšetření pomocí oftalmoskopu nebo jiného vhodného nástroje, a to nejlépe u všech pokusných zvířat, alespoň však u všech pokusných zvířat ze skupin s vysokou dávkou a z kontrolních skupin. Pokud se zjistí změny na očích nebo pokud klinické příznaky ukazují na nutnost vyšetření očí, vyšetří se všechna pokusná zvířata. U dlouhodobých studií se oftalmologické vyšetření provede ve 13. týdnu stáří pokusných zvířat. Oftalmologická vyšetření není nutné provádět tehdy, jsou-li již k dispozici údaje z jiných podobně dlouhých studií s podobnými úrovněmi dávek.

#### 1.6.4 Hematologické a biochemické vyšetření

Pokud se studie neurotoxicity provádí v kombinaci se studií systémové toxicity po opakované dávce, provede se hematologické vyšetření a stanovení klinických biochemických parametrů tak, jak je uvedeno v příslušné metodě studie systémové toxicity. Odebírání vzorků se provede tak, aby se minimalizovaly jakékoliv účinky na nervový systém a chování.

#### 1.6.5 Histopatologie

Neuropatologické vyšetření se navrhne tak, aby doplnilo a rozšířilo pozorování provedená v rámci této studie během fáze *in vivo*. Tkáň alespoň 5 pokusných zvířat každého pohlaví z každé skupiny (viz tabulka 12 a další odstavec) se fixují *in situ* za použití obecně uznávaných perfuzních a fixačních technik<sup>7a)</sup>. Zaznamenají se jakékoliv výrazné změny. Pokud se studie provádí jako samostatná studie neurotoxicity nebo studie charakterizující neurotoxické účinky, lze použít zbytek pokusných zvířat buď ke specifickým neurobehaviorálním<sup>7a)</sup>, neuropatologickým<sup>7a)</sup>, neurochemickým<sup>7a)</sup>, nebo elektrofyziologickým<sup>7a)</sup> postupům, které mohou doplnit zde popsané postupy a vyšetření, anebo zvýšit počet subjektů vyšetřovaných k histopatologickým účelům. Tyto doplňkové postupy jsou zvláště užitečné tehdy, pokud empirická pozorování nebo očekávané účinky ukazují na specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity<sup>7a)</sup>. Je také možné zbytek pokusných zvířat použít k běžným patologickým hodnocením, která jsou popsána v metodě studie po opakované dávce.

U všech tkáňových vzorků zalitých parafínem se provede běžný postup barvení, např. pomocí hematoxylinu a eosinu (H&E), a mikroskopické vyšetření. Jsou-li pozorovány nebo existuje-li podezření na příznaky periferní neuropatie, vyšetří se vzorky periferních nervů zalitých do pryskyřic (vosků). Klinické příznaky mohou rovněž poukázat na další místa, která je nutné vyšetřit, nebo na nutnost použít speciální postupy barvení. Pokyny k určení dalších míst, která je třeba vyšetřit, lze nalézt v literatuře<sup>7a)</sup>. K prokázání charakteristických typů patologické změny může přispět i odpovídající speciální barvení<sup>7a)</sup>.

U reprezentativních řezů centrálního a periferního nervového systému se provede histologické vyšetření<sup>7a)</sup>. Mezi vyšetřované oblasti obvykle patří: přední mozek, střední část mozku, včetně řezu hippocampem, střední mozek, mozeček, Varolův most, prodloužená mícha, oko se zrakovým nervem a sítnicí, mícha v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorsální kořenová ganglia, dorsální a ventrální kořenová vlákna, proximální část *n. ischiadicus* a proximální část *n. tibialis* (v oblasti kolena) a *n. tibialis* z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy. Pozornost je nutné věnovat uspořádání cév v oblasti nervového systému. Rovněž se vyšetří vzorky z kosterního svalstva, a to zvláště z lýtkového svalu. Zvláštní pozornost je nutné věnovat místům s buněčnou a vláknitou strukturou a těm strukturám v oblasti CNS a PNS, o nichž je známo, že na ně mají neurotoxické látky velký vliv.

Informace o neuropatologických změnách, které obvyklé vyplývají z expozice toxickým látkám, lze nalézt v literatuře<sup>7a)</sup>. Doporučuje se postupné vyšetření tkáňových vzorků, při kterém se porovnají nejprve vzorky řezů ze skupiny s vysokou dávkou se vzorky řezů z kontrolní skupiny. Nejsou-li ve vzorcích z těchto skupin zjištěny žádné neuropatologické změny, není třeba provádět další analýzu. Jsou-li zjištěny ve skupině s vysokou dávkou neuropatologické změny, je třeba následně okódotovat a vyšetřit vzorky ze všech potenciálně zasažených tkání ze skupin se střední a nízkou dávkou.

Pokud je během kvalitativního vyšetření zjištěna přítomnost neuropatologických změn, provede se druhé vyšetření všech oblastí nervového systému, které vykazují tyto změny. Okódují se řezy ze všech dávkových skupin ze všech potenciálně zasažených oblastí a vyšetří v náhodném pořadí bez znalosti kódu. Zaznamená se četnost a závažnost všech lézí. Po zhodnocení všech oblastí ze všech dávkových skupin se kód odkryje a provede se statistická analýza za účelem vyhodnocení vztahu dávka-odezva. U každé léze se popíše příklady různých stupňů závažnosti.

Neuropatologické výsledky se vyhodnotí v kontextu s pozorováním a měřením chování a rovněž spolu s dalšími údaji z předchozích a souběžných studií systémové toxicity zkoušené látky.

## 2 DATA

### 2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se jednotlivá data. Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou experimentální nebo kontrolní skupinu uvede počet pokusných zvířat na začátku zkoušky, počet pokusných zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo počet pokusných zvířat utracených z humanitních důvodů a doba uhynutí nebo humanitního utracení, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání, typu a závažnosti jakýchkoliv příznaků toxicity, počet pokusných zvířat vykazujících léze, včetně typu a závažnosti léze (lézí).

### 2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky studie je třeba vyhodnotit z hlediska výskytu, závažnosti a korelace neurobehaviorálních a neuropatologických účinků (rovněž i neurochemických nebo elektrofyziologických účinků, jsou-li provedena doplňující vyšetření) a z hlediska dalších zjištěných nepříznivých účinků. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnými a obecně uznávanými statistickými metodami. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie.

### 3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy<sup>9),10)</sup> musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální vlastnosti (včetně isomerie, čistoty a fyzikálně-chemických vlastností),
- údaje o identitě.

Vehikulum (pokud bylo použito):

- zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

- použité druhy a kmen,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat,
- původ, podmínky chovu, aklimatizace, krmivo atd.,
- hmotnost jednotlivých pokusných zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- podrobnosti o úpravě směsi zkoušené látky či přípravě krmiva, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,
- specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,
- podrobnosti o způsobu aplikace zkoušené látky,
- zdůvodnění výběru úrovní dávek,
- zdůvodnění způsobu aplikace a trvání expozice,
- přepočítání koncentrace zkoušené látky v krmivu nebo pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti,
- podrobnosti o krmivu a kvalitě vody.

Pozorovací a zkušební postupy:

- podrobnosti o přiřazení pokusných zvířat z jednotlivých skupin do podskupin s perfuzí,

- podrobnosti o systémech posuzování, včetně kritérií a posuzovacích stupnic pro jednotlivá měření v rámci podrobných klinických pozorování,
- podrobnosti o funkčních testech pro měření reakce různých smyslových orgánů na smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a dotykové), pro hodnocení síly úchopu, motorické aktivity (včetně podrobností o automatických zařízeních pro zjišťování aktivity) a další použité postupy,
- podrobnosti oftalmologických vyšetření, hematologických a biochemických vyšetření s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,
- podrobnosti o specifických neurobehaviorálních, neuropatologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech.

#### Výsledky:

- tělesná hmotnost a její změny, včetně tělesné hmotnosti v době utracení,
- spotřeba krmiva a případně vody,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávek, včetně popisu příznaků toxicity nebo mortality,
- povaha, závažnost a trvání (doba nástupu a následný průběh) podrobných klinických nálezů (zda jsou vratné nebo nevratné),
- podrobný popis všech výsledků funkčních testů,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech neurobehaviorálních, neuropatologických a neurochemických nebo elektrofyziologických výsledků, jsou-li k dispozici,
- údaje o absorpci a metabolismu, jsou-li k dispozici,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné.

#### Diskuse a interpretace výsledků.

- informace o závislosti účinku na dávce,
- význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky,
- dávková úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků (NOAEL),

— je žádoucí uvést konkrétní vyjádření o celkové neurotoxicitě zkoušené chemické látky.

Závěry.

**Tabulka 12:**

**Minimální počet pokusných zvířat na skupinu, provádí-li se studie neurotoxicity samostatně nebo v kombinaci s dalšími studii**

	TYP PROVEDENÉ STUDIE NEUROTOXICITY:			
	Samostatná studie	Kombinovaná studie s 28 denní studií	Kombinovaná studie s 90 denní studií	Kombinovaná studie se studií chronické toxicity
Počet pokusných zvířat na skupinu	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	15 samců a 15 samic	25 samců a 25 samic
Počet pokusných zvířat vybraných k funkčnímu testování, včetně podrobných klinických pozorování	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic
Počet pokusných zvířat vybraných k perfuzi <i>in situ</i> a neurohistopatologickému vyšetření	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic
Počet pokusných zvířat vybraných k pozorování toxicity po opakované dávce subchronické/chronické, k hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, k histopatologickému vyšetření atd., jak je uvedeno v příslušných <i>Doporučeních</i>		5 samců a 5 samic	10 samců <sup>†</sup> a 10 samic <sup>†</sup>	20 samců <sup>†</sup> a 20 samic <sup>†</sup>
Případná doplňující pozorování	5 samců a 5 samic			

<sup>†</sup> Zahrnuto je pět pokusných zvířat vybraných k funkčnímu testování a podrobnému klinickému pozorování jako součást studie neurotoxicity

**Tabulka 13:**

**Četnost klinických pozorování a funkčních testů**

Typ pozorování		Délka studie			
		akutní	28 denní	90 denní	chronická
U všech pokusných zvířat	Celkový zdravotní stav	Denně	Denně	Denně	Denně
	Mortalita/morbidita	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně
U všech pokusných zvířat vybraných k funkčním pozorováním	Podrobná klinická pozorování	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– v průběhu 8 h po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku</li> <li>– 7. a 14. den po skončení dávkování</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– poté jednou týdně</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– jednou během prvního nebo druhého týdne expozice</li> <li>– poté měsíčně</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– jednou na konci prvního měsíce expozice</li> <li>– poté každé tři měsíce</li> </ul>
	Funkční testy	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– v průběhu 8 h po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku</li> <li>– 7. a 14. den po skončení dávkování</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– během čtvrtého týdne aplikace co nejbliže ke konci období expozice</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– jednou během prvního nebo druhého týdne expozice</li> <li>– poté měsíčně</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– před první expozicí</li> <li>– jednou na konci prvního měsíce expozice</li> <li>– poté každé tři měsíce</li> </ul>